

# Tumor angiogenesis : an in vitro study

Citation for published version (APA):

Lichtenbeld, H. H. C. (1993). *Tumor angiogenesis : an in vitro study*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19930930hl>

**Document status and date:**

Published: 01/01/1993

**DOI:**

[10.26481/dis.19930930hl](https://doi.org/10.26481/dis.19930930hl)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

Growing tumors remain small until the onset of neovessel formation. This process of tumor vascularization (tumor angiogenesis) is investigated in an in vitro model in this thesis. Tumor angiogenesis can be classified roughly into three main features, endothelial cell proliferation, activation and migration in response to tumor cells. To evaluate these aspects of the angiogenic phenomenon we developed an in vitro model as described in this work. In chapter 1 an overview is given of the current knowledge on tumor angiogenesis and the scope of the study including a brief outline of the work. Chapter 2 describes the development of an in vitro proliferation assay in order to study the proliferative response of endothelial cells (human umbilical vein (HUVEC) and bovine adrenal cortex capillary (BCE) endothelial cells) after exposure to tumor cells. We compared the mitogenic effect of conditioned medium from tumor cells cultured as monolayers to that of tumor cells cultured as avascular spheroids (colorectal tumor cell lines HT29, SW620, SW480 and CaCo2). It was found that conditioned media of the spheroid cultures were significantly more mitogenic to endothelial cells than that of monolayer cultures. Furthermore an inverse relationship was found for the mitogenic effect of the tumor conditioned medium and the age of the spheroids that conditioned the medium. The more mature the spheroids were, the less mitogenic the conditioned medium (chapter 3). In order to investigate the activation and migration aspects in the angiogenic process, we developed a model based on a previously described collagen type I matrix model. In this model (chapter 4), endothelial cells were allowed to aggregate before embedding in a collagen gel. After 24 hours the aggregates had formed sprouts. These sprouts contained a lumen that was lined with endothelial cells. When tumor spheroids were introduced in this model, the length of the sprouts was not affected but extracellular vesicle-like structures were seen on the endothelial cell sprouts. The vesicles formed on endothelial cell sprouts upon coculturing with tumor spheroids, resembled the vesicles that were formed on erythrocytes and thrombocytes upon activation. The vesicles formed on erythrocytes and thrombocytes were procoagulant in nature leading to the formation of fibrin. The vesicles formed on endothelial cell sprouts upon stimulation with tumor spheroids exhibited also procoagulant activity since an increased amidolytic activity towards chromogenic substrate S2337 was detected. This amidolytic activity was identified as factor X, using antibodies against factor X, that could inhibit factor X/Xa expression. The activity was independent of tissue factor and could be blocked by  $\text{HgCl}_2$  and Iodoacetamide, which points to the involvement of SH-groups.

In the tumor bed fibrin deposits are found. The findings in our experiments could lend support for the hypothesis that tumors induce fibrin (formation) in order to create a provisional matrix in which the tumor can expand itself. Furthermore, it is thought this fibrin protects the tumor nodule from host defence mechanisms.

In an attempt to obtain information on the compound/agent(s) from the tumor that could be responsible for the induction of the procoagulant response in the endothelial cells, we investigated in chapter 5 the effect of exogenously added peroxides on endothelial cells,

since it has been found that tumors secrete large amounts of reactive oxygen species like peroxides. Subsequently the formation of vesicles and the procoagulant response of endothelial cells upon activation by the peroxides was evaluated.

The results indicated that treatment of endothelial cells with peroxides induced the formation of similar vesicles on the endothelial cells and increased the procoagulant response as well. These effects were time and dose-dependent and could be inhibited by the anti-oxidant d- $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). These findings suggested a possible role for reactive oxygen species in the angiogenic process in tumors, since reactive oxygen species are properties shared by many tumors.

Another aspect in (tumor) angiogenesis is the presence of mast cells. Shortly before the onset of the angiogenic process mast cells accumulate around the tumor nodule. Therefore we added mast cells (rat peritoneal mast cells) to our matrix model (in which already endothelial cell aggregates and tumor spheroids were present) as is described in chapter 6, and evaluated their effect on the vesicle formation and procoagulant response of the endothelial cells. Also the effect of mast cell lysates was tested on the proliferation of endothelial cells. Mast cell lysate induced a dose-related stimulating effect on the proliferation of endothelial cells. Mast cell lysates strongly inhibited thrombin activity, comparable to the effect of the known anti-thrombotic combination of heparin plus anti-thrombin III. Mast cell lysates accelerated the formation of fibrin on endothelial cell monolayers and upon addition of mast cells to endothelial cell aggregates in the matrix model, a procoagulant activity was detected. Both tumor cells and mast cells led to the enhanced expression of factor X/Xa, but in case of mast cells, Xa was preferentially expressed at the expense of factor X, and moreover this expression could no longer be blocked by a specific anti-X antibody, suggesting a conformational change of factor X.

In chapter 7, two commonly used chemotherapeutic agents (5-fluorouracil and cis-platinum) in cancer treatment, were introduced to endothelial cells. These agents inhibited endothelial cell proliferation and caused a dose dependent delay in fibrin formation, which appeared to be cell associated. No differences were detected in factor X/Xa expression on endothelial cells treated with the drugs. These preliminary results suggest that more studies on the effects of chemotherapeutic drugs on endothelial cells could provide information on possible dualistic effects of the drugs as proliferation inhibitors as well as anti-angiogenic agents. This may contribute to a better understanding of drug-treatment on neoplastic growth and therefore improve antineoplastic interventions.

Based on the results from this work, we suggest a mechanism in tumor angiogenesis (chapter 8). First the endothelial cell is either directly or indirectly oxidatively triggered by tumor cells, leading to lipid peroxidation of the cell membrane resulting in vesicle formation. Second, this creates a procoagulant response that could lead to the formation of fibrin which supports tumor growth, angiogenesis and protects the tumor nodule from the host immune system. At this point, mast cells could play a regulating role in fibrin formation. Subsequently, growth factors generated by the tumor as well, will support further establishment of a capillary network in the tumor.

## Samenvatting.

Het is gebleken dat tumoren klein en relatief ongevaarlijk blijven zolang er geen netwerk van bloedvaten aanwezig is. Het proces waarbij de tumor een vaatbed induceert, tumor angiogenese, wordt in dit proefschrift onderzocht met behulp van een in vitro model. Nieuwe bloedvaten worden door de tumor uit bestaande bloedvaten van de gastheer gerecruteerd. Hiertoe worden endotheelcellen van bestaande vaten geactiveerd waarna vervolgens de endotheelcel migreert (zich verplaatst) en prolifereert (zich vermenigvuldigt). Om deze parameters onder invloed van de tumor nader te bestuderen wordt een in vitro model beschreven waar de endotheelcel en de tumorcel zijn samengebracht.

In hoofdstuk 1 wordt een overzicht gegeven van de huidige stand van zaken met betrekking tot tumor angiogenese. Ook worden het doel en een kort overzicht van de opzet van de studie gegeven. Hoofdstuk 2 beschrijft de ontwikkeling van een in vitro proliferatie model waarin de proliferatieve reactie van de endotheelcel (humane veneuze navelstreng endotheelcellen (HUVEC) en runder bijnierschors capillair endotheel (BCE) cellen) op de aanwezigheid van tumorcellen bestudeerd wordt. Het mitogene (proliferatie-stimulerende) effect van geconditioneerd medium afkomstig van tumorcellen gekweekt als monolaag wordt hierbij vergeleken met geconditioneerd medium afkomstig van tumor cellen gekweekt als sferoiden. Gebruik wordt gemaakt van de colorectale tumor cellijnen SW620, SW480, HT29 en CaCo2. Gevonden is dat geconditioneerd medium afkomstig van sferoiden significant sterker mitogeen is dan geconditioneerd medium afkomstig van tumoren gekweekt in monolagen. Een omgekeerd evenredige relatie werd gevonden tussen het mitogene effect van het tumor geconditioneerde medium van sferoiden en de leeftijd van deze sferoiden. Hoe ouder de sferoiden, hoe minder mitogeen het geconditioneerde medium (hoofdstuk 3).

Om de parameters activatie en migratie van het angiogenetische proces te bestuderen wordt een gemodificeerd model beschreven gebaseerd op een matrix model. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de matrix component collageen type I. In dit model (hoofdstuk 4) worden endotheelcellen zodanig gekweekt dat ze gaan aggregeren. Vervolgens worden deze aggregaten in de collageen matrix ingebed en treedt er na verloop van tijd vorming van tubulaire (buis) structuren op, zgn. spruiten. Deze spruiten bevatten een lumen (holte) die bekleed is met endotheelcellen. Wanneer aan dit systeem tumor sferoiden worden toegevoegd blijkt dat geen invloed op de lengte maar wel op de morfologie van de spruiten te hebben. Extracellulaire vesikel-achtige (bolletjes) structuren worden waargenomen. Deze vesikels lijken sterk op vesikels die gevormd worden op trombocyten en erythrocyten nadat deze zijn geactiveerd. De vesicles op trombocyten en erythrocyten zijn procoagulant (stolaktief), wat uiteindelijk zal resulteren in de vorming van fibrine. De vesicles zoals die gevonden worden op de endotheelcellen nadat deze geactiveerd zijn door tumorcellen vertonen een toegenomen activiteit voor het chromogeen substraat S2337. Deze activiteit werd geïdentificeerd (met behulp van een

antilichaam) als factor X. Dit antilichaam kan zowel factor X als de geactiveerde vorm Xa, remmen. Deze procoagulant activiteit blijkt onafhankelijk van Weefsel Factor (Tissue Factor) te zijn en kan geblokkeerd worden door  $\text{HgCl}_2$  en Iodoacetamide, hetgeen betekent dat SH-bindingen betrokken zijn bij deze vorm van activatie.

In vivo wordt in en rond tumoren fibrine waargenomen. Deze waarneming en de bovenbeschreven resultaten m.b.t. de procoagulant reactie van de endotheelcel na activatie onder invloed van tumor sferoiden, zijn mogelijk met elkaar in overeenstemming. De hypothese bestaat dat tumoren in staat zijn de vorming van fibrine te induceren. Dit zou als voordeel voor de tumor kunnen hebben dat de fibrine enerzijds als tijdelijke matrix gebruikt kan worden om in te groeien en anderzijds als beschermmantel tegen de immuunrespons (afweer) van de gastheer.

Experimenten om inzicht te krijgen in een mogelijk mechanisme dat door de tumor gebruikt kan worden om de procoagulant respons van de endotheel cel te induceren, worden in hoofdstuk 5 beschreven. Hiertoe wordt uitgegaan van het gegeven dat peroxides in relatief grote hoeveelheden door tumoren worden gegenereerd. In de beschreven experimenten worden peroxides toegevoegd aan de endotheelcel aggregaten en deze aggregaten worden vervolgens geëvalueerd op de vorming van vesicles en op een toename in procoagulant activiteit. De resultaten laten zien dat inderdaad vesicles worden gevormd en dat de procoagulant activiteit stijgt onder invloed van peroxides. Deze effecten blijken zowel dosis- als tijdsafhankelijk en kunnen worden geremd door d- $\alpha$ -tocopherol (vitamine E). Deze gegevens ondersteunen het idee dat peroxides een rol zouden kunnen spelen in het angiogenetisch proces in tumoren.

Een ander fenomeen dat wordt waargenomen bij tumor angiogenese is de aanwezigheid van grote aantallen mestcellen vlak voor de eigenlijke angiogenese optreedt. Hoofdstuk 6 geeft de resultaten weer van de experimenten waarbij mestcellen (peritoneale rattemestcellen) worden toegevoegd aan de eerder beschreven modellen. Ook wordt het effect van mestcel lysaat geëvalueerd op de thrombine activiteit. Mestcel-lysaat stimuleert (dosis-afhankelijk) endotheelcel proliferatie. Mestcel-lysaat blijkt een sterke remmer van thrombine activiteit. Dit effect ligt in dezelfde orde-grootte als dat van het bekende anti-stolcomplex heparine plus antithrombine III. Dit complex kan door polybreen geremd worden, echter het anti-stol effect dat door mest cellysaat wordt veroorzaakt kan slechts gedeeltelijk door polybreen geremd worden. Mestcel-lysaat versnelt significant de vorming van fibrine, zoals gemeten op endotheelcel monolagen. Na toevoeging van mestcellen aan het matrix model wordt ook hier een procoagulante activiteit waargenomen. Zowel de tumorcellen als de mestcellen veroorzaken een verhoogde expressie van factor X/Xa op de endotheel cellen, maar in het geval van de mestcellen blijkt factor Xa bij voorkeur tot expressie te worden gebracht, ten koste van factor X. Opmerkelijk hierbij is het feit dat de factor X/Xa expressie niet langer geremd kan worden door anti-X antilichaam, wat zou betekenen dat een conformatie verandering in de structuur van factor X is opgetreden.

In hoofdstuk 7 worden twee cytostatica (5-Fluorouracil en Cisplatinum), die bij behandeling van colonkanker gebruikt worden, getest op hun effect op endotheelcellen. De cytostatica veroorzaken een significante proliferatie remming en een dosis afhankelijke vertraging in fibrine vorming. Op de behandelde endotheelcellen worden geen verschillen waargenomen in factor X/Xa expressie. Deze resultaten, hoewel prematuur, ondersteunen

het idee dat het zinvol is om cytostatica te testen op een mogelijk dualistisch effect. Niet alleen zouden cytostatica een anti-proliferatieve werking hebben op de tumorcel, maar mogelijk ook een antiangiogene werking via de endotheelcel. Meer inzicht zou kunnen bijdragen tot een beter begrip en een gerichtere aanpak in de behandeling van kanker.

In hoofdstuk 8 tenslotte, wordt op grond van de resultaten zoals uit dit onderzoek verkregen zijn, een hypothetisch mechanisme voor tumor angiogenese voorgesteld. Hierbij wordt uitgegaan van het feit dat de productie van peroxides een eigenschap is die door alle tumoren wordt gedeeld. De endotheelcel wordt door de peroxides van de tumor (al dan niet direct) geactiveerd wat leidt tot lipid-peroxidatie van de membraan (membraan verstoringen), met als gevolg dat vesicle-formatie optreedt. Vervolgens ontstaat een procoagulant situatie welke uiteindelijk tot de vorming van fibrine kan leiden. Mestcellen spelen vermoedelijk een regulerende rol in dit proces van fibrine vorming. Fibrine ondersteunt tumorgroei en tumorangiogenese. Tenslotte zullen factoren zoals onder andere cytokinen en groeifactoren afkomstig van de tumor, bijdragen tot de volledige ontwikkeling van een capillair netwerk dat vervolgens een essentiële rol speelt bij het ontstaan van de twee typische kenmerken van maligniteit (kwaadaardigheid): invasieve groei (binnendringen in weefsels) en metastasering (uitzaaiing).

De auteur dankt de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde en de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde.

De auteur dankt de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde en de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde. De auteur dankt de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde en de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde. De auteur dankt de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde en de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde.

De auteur dankt de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde en de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde.

De auteur dankt de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde en de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde. De auteur dankt de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde en de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde.

De auteur dankt de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde en de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde. De auteur dankt de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde en de leden van de jury van het proefschrift voor de toelating tot de titel van doctor in de Geneeskunde.